

学校编码: 10384
学号: 24520131153461

分类号____ 密级____
UDC____

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

**PKM2 通过 ERK 介导抑制顺铂诱导的
caspase 依赖性肝癌细胞凋亡**

**Pyruvate kinase M2 inhibits cisplatin induced
caspase-dependent apoptosis via ERK-mediated signaling
pathway in hepatocellular carcinoma cells**

湛小春

指导教师名称: 任建林教授

专 业 名 称: 内科学 (消化系病方向)

论文提交日期: 2016 年 4 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 4 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

- ☐ 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。
- ☐ 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

M2 型丙酮酸激酶 (pyruvate kinase isoenzyme type M2, PKM2) 在肿瘤代谢和生长等方面发挥重要作用。此外, PKM2 还可作为蛋白激酶及辅助转录因子, 调控相关基因的转录表达, 促进肿瘤细胞的增殖。我们实验室前期已经证实了 PKM2 在肝细胞癌中高表达, 并通过 EGF/EGFR 及 TGF β /TGF β R 信号通路调控肝癌细胞的迁移、侵袭。本课题研究目的在于进一步探索 PKM2 在肝癌细胞增殖与凋亡方面的调控作用及相关分子生物学机制。

采用短发夹 RNA 转染 HepG2 和 Huh7 两株肝癌细胞株, 并筛选稳定沉默 PKM2 表达的细胞株。TUNEL 法及流式细胞术检测证实, 在顺铂药物诱导下, 基因沉默 PKM2 后的肝癌细胞凋亡率较对照组显著增加。随后, 我们应用 Western Blot 检测了凋亡相关蛋白表达的变化, 结果显示沉默 PKM2 表达的肝癌细胞中, P53 磷酸化水平显著上调, 并启动了细胞凋亡: 死亡受体介导的凋亡通路中, 死亡受体 Fas、FADD 及其下游的靶基因 caspase8 被活化, Caspase 活性片段 p18、p10 被释放后进一步激活 caspase9 及 caspase3; 线粒体凋亡通路中, 促凋亡蛋白 Bid、Bax 表达水平升高, 而抗凋亡蛋白 Bcl-2 未见明显变化。

此外, 我们发现基因沉默 PKM2 后可激活细胞外信号转导激酶 (ERK) 相关信号通路。磷酸化激活的 ERK 可由胞质转位到核内, 核浆分离结果显示: 顺铂可诱导 ERK 的活化, 且相比对照组, 基因沉默 PKM2 后, ERK 活化入核增多。荧光共聚焦、免疫共沉淀等实验证实了 PKM2 与 ERK 在细胞质内存在共定位及蛋白相互作用。

综上, PKM2 通过 ERK 介导的 caspase 依赖性途径参与调控肝癌细胞的凋亡。本研究为树立 PKM2 为肝癌靶向治疗重要靶标分子提供理论依据。

关键词: M2 型丙酮酸激酶; 肝癌; 细胞凋亡; 细胞外信号转导激酶

Abstract

The M2 splice isoform of pyruvate kinase (PKM2) is important for cancer metabolism and tumour growth. PKM2 has been shown to be essential for aerobic glycolysis (the Warburg effect) in tumors. Other findings reveal a novel role for PKM2 as a transcriptional coactivator and promote cell proliferation. Our previous study revealed that PKM2 is overexpressed in hepatocellular carcinomas (HCC) and regulates HCC cell mobility and invasion via EGF/EGFR and TGF β /TGF β R signaling pathway. In the current study, the effect of PKM2 knockdown on the apoptosis of human hepatic cancer cells (HepG2 and Huh7) were examined. We aimed to explore the role and the biological mechanisms for PKM2 in regulating the cell apoptosis.

In the present study, we employed stable transfection with short hairpin RNA to stably silence the expression of PKM2 in the HepG2, Huh7 hepatocellular carcinoma cell lines. We used the TUNEL assay and FACS analysis to demonstrate that cisplatin induced apoptosis was significantly increased in HCC cells with silenced PKM2. Western blots showed that p53 expression and phosphorylation were significantly increased in PKM2 defective cells, thereby initiating the apoptotic pathways. In the death receptor-mediated pathway, expression of the FAS receptor, FADD and their downstream target caspase-8 was activated, resulting an increasing release of active fragments p18 and p10. Increased activated caspase-8-mediated cleavage and activation of downstream effector caspases such as caspase-9 and caspase-3 was also observed in HepG2 si-PKM2 cells as compared to control. In the mitochondria-mediated pathway, expression of pro-apoptotic Bcl-2 family members such as Bid, Bax were increased in HepG2 si-PKM2 cells. Moreover, silencing of PKM2 induced activation of ERK signaling pathway and affected the subcellular localization of ERK. We further verified that PKM2 and ERK co-localized in the cytoplasm and PKM2 acted as a binding protein to ERK both in vivo and vitro.

Therefore, we conclude that silencing of PKM2 enhances caspase-dependent apoptosis through ERK-mediated pathway in hepatocellular carcinoma cells. Our findings suggest that PKM2 could be an attractive therapeutic target gene for human

hepatocarcinoma therapy.

Key words: PKM2; Hepatocellular carcinoma; Apoptosis; ERK

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

第一章 前言	1
1.1 M2 型丙酮酸激酶	1
1.1.1 丙酮酸激酶 (PK) 的结构与亚型	1
1.1.2 M2 型丙酮酸激酶 (PKM2) 的酶活性调节	1
1.1.3 M2 型丙酮酸激酶 (PKM2) 的表达调节	2
1.1.4 M2 型丙酮酸激酶 (PKM2) 参与肿瘤代谢	3
1.1.5 M2 型丙酮酸激酶 (PKM2) 参与信号通路调控	4
1.2 肝癌的发生机制	5
1.3 细胞凋亡	7
1.3.1 细胞凋亡通路	7
1.3.2 P53 基因	8
1.3.3 Bcl-2 家族	8
1.4 细胞外信号调节激酶 (ERK)	9
第二章 材料与方法	11
2.1 材料	11
2.1.1 细胞、菌株、质粒	11
2.1.2 实验所用引物	11
2.1.3 仪器与耗材	11
2.1.4 试剂	13
2.1.5 主要试剂配制方法	15
2.2 方法	17
2.2.1 靶向 PKM2 基因的 siRNA 重组质粒的构建	17
2.2.2 稳转细胞功能学研究	28
2.2.3 PKM2 参与细胞凋亡信号通路的研究	30

2.2.4 PKM2 与 ERK 相互作用.....	31
第三章 结果与分析	35
3.1 基因沉默 PKM2 促进顺铂诱导的肝癌细胞凋亡	35
3.1.1 PKM2 的表达及沉默效果验证	35
3.1.2 TUNEL 法检测	35
3.1.3 流式细胞术检测	37
3.2 基因沉默 PKM2 后凋亡相关蛋白的表达	38
3.2.1 RT-PCR 检测凋亡相关蛋白的变化.....	38
3.2.2 PKM2 基因沉默促进 P53 表达	38
3.2.3 Western blot 检测凋亡相关蛋白的变化	39
3.3 PKM2 调控肝癌细胞凋亡的分子机制探讨	40
3.3.1 ERK 通路介导 PKM2 对肝癌细胞凋亡的调控效应.....	40
3.3.2 PKM2 与 ERK 共定位于细胞质	41
3.3.3 PKM2 与 ERK 相互结合	42
第四章 讨论与展望	43
4.1 肝癌的研究现状	43
4.1.1 分子及生化标志物.....	43
4.1.2 miRNAs	43
4.1.3 表观遗传学改变	44
4.1.4 肿瘤微环境	44
4.2 课题研究成果与意义	45
4.2.1 基因沉默 PKM2 后促进肝癌细胞凋亡	46
4.2.2 基因沉默 PKM2 后引起细胞凋亡相关蛋白表达改变	46
4.2.3 PKM2 通过 ERK 介导 caspase 依赖性细胞凋亡	47
4.3 展望	48
参 考 文 献	49
英文缩略词.....	56

Table of Contents

Chapter 1 Introduction	1
Section1 Pyruvate kinase M2(PKM2)	1
1. 1. 1 Discovery and isoform of PKM2	1
1. 1. 2 Activity regulation of PKM2	1
1. 1. 3 Expression regulation of PKM2	2
1. 1. 4 Metabolic regulation by PKM2	3
1. 1. 5 Signaling regulation by PKM2	4
Section2 The mechanism of Hepatocellular carcinoma	5
Section3 Cell apoptosis	7
1. 3. 1 Cell apoptosis pathway	7
1. 3. 2 The P53 gene	8
1. 3. 3 The Bcl-2 family	8
Section4 Extracellular-signal regulated kinase (ERK)	9
Chapater2 Materials and Methods	11
Section1 Materials	11
2. 1. 1 Cell lines and plasmid	11
2. 1. 2 Primers	11
2. 1. 3 Instruments and consumables	11
2. 1. 4 Reagents	13
2. 1. 5 Preparation methods of main reagents	15
Section2 Methods	17
2. 2. 1 The costruction of si-PKM2 plasmid	17
2. 2. 2 The function of stable PKM2-knockdown cell lines in HCC	28
2. 2. 3 The regulation of cell apoptosis pathway by PKM2 in HCC	30
2. 2. 4 Interaction between PKM2 and ERK	31

Chapter 3 Experimental results and Conclusion	35
Section1 Silencing of PKM2 promotes cisplatin induced apoptosis in HCC cell lines	35
3. 1. 1 The expression of PKM2 in HCC cell lines and the validation of si-PKM2 cell lines costruction	35
3. 1. 2 TUNEL assay indicates that silencing of PKM2 enhances cisplatin induced apoptosis in HCC cell lines	35
3. 1. 3 Silencing of PKM2 enhances cisplatin induced apoptosis in HCC cell lines further validated by flow cytometry assay	37
Section2 Silencing of PKM2 enhances the apoptosis-related protein in HCC cell lines	38
3. 2. 1 RT-PCR	38
3. 2. 2 Silencing of PKM2 increases the expression of P53	38
3. 2. 3 Silencing of PKM2 alters the expression of apoptosis-related protein	39
Section3 The molecular mechanism of PKM2 regulating apoptosis in HCC cell lines	40
3. 3. 1 ERK pathway mediates the effect of PKM2 on the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells	40
3. 3. 2 PKM2 and ERK colocalized in the cytoplasm	41
3. 3. 3 PKM2 acts as binding protein of ERK both in vitro and in vivo	42
Chapter4 Discussion and prospect	43
Section1 Research progress of hepatocellular carcinoma	43
4. 1. 1 Molecular and biochemical cellular markers	43
4. 1. 2 miRNAs	43
4. 1. 3 Epigenetic variations	44
4. 1. 4 Tumor microenvironment	44
Section2 Research results and significance	45
4. 2. 1 Silencing of PKM2 enhances cisplatin induced apoptosis in HCC cell lines	46
4. 2. 2 Silencing of PKM2 enhances the apoptosis-related protein in HCC	

celllines	46
4. 2. 3 Pyruvate kinase M2 inhibits caspase-dependent apoptosis via ERK-mediated signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells	47
Section3 Prospect.....	49
References.....	50
Abbreviation.....	56
Acknowledgement.....	57

第一章 前言

1.1 M2 型丙酮酸激酶

1.1.1 丙酮酸激酶（PK）的结构与亚型

丙酮酸激酶（pyruvatekinase, PK），是一种分子量约为 250 kDa 的蛋白质，作为细胞糖酵解途径中的关键限速酶，其功能主要是催化磷酸烯醇式丙酮酸（phosphoenolpyruvate, PEP）和 ADP 最终生成丙酮酸和 ATP。在哺乳动物细胞中，PK 存在四种同工酶亚型，分别是 L、R、M1 和 M2 型。其中 PKL 和 PKR 是由同一染色体基因 PKLR 编码，通过不同的组织特异性启动子启动转录表达，分别表达于肝肾细胞和红细胞中；而 PKM1 和 PKM2 则由 PKM 基因编码，是转录过程中选择性剪切 PKM 基因前体 mRNA 的产物，其中 PKM1 被剪切掉了外显子 10，在大多数成体组织中表达，PKM2 被剪切掉了外显子 9，主要表达于胚胎组织和增殖细胞中，尤其在肿瘤细胞中高表达[1]。PKM1 和 PKM2 仅相差 22 个氨基酸。

1.1.2 M2 型丙酮酸激酶（PKM2）的酶活性调节

PKM2 是糖酵解过程中最重要的限速酶。它由四个亚基构成，主要有两种形式存在，高活性的四聚体形式和低活性的二聚体形式。四聚体形式的 PKM2 对其底物磷酸烯醇式丙酮酸（PEP）有很高的亲和力，酶催化能力强，在细胞质中能与其他糖酵解酶形成糖酵解酶复合物，能高效催化葡萄糖，产生大量 ATP，因此，PKM2 四聚体形式主要存在于分化的组织和正常增殖的细胞中。与此相反，二聚体形式的 PKM2 常存于肿瘤细胞中，与底物磷酸烯醇式丙酮酸（PEP）的亲和力较四聚体低，几乎没有活性，使得糖酵解途径被阻滞在最后阶段，导致中间产物累积，经多种代谢途径用于合成核酸、脂质和蛋白质等生物大分子，以满足肿瘤细胞增殖的需求。正常情况下，两者处于动态平衡，且两种构象之间可发生相互转化，四聚体与二聚体的比例决定了由葡萄糖转化生成的丙酮酸是用于产生能量还是合成生物大分子[2]。

PKM2 的四聚体形式和二聚体形式之间的相互转化受多种因素调控。一些糖代谢中间产物,如 1,6-二磷酸果糖 (Fructose-1,6-bisphosphate, FBP), 是 PKM2 的变构激活剂,能与 PKM2 结合促进其四聚体形式的构成,提高 PKM2 酶活性,进而使 FBP 向下游转化,但当 FBP 含量继续下降到一定程度时,PKM2 又可以重新变构成二聚体低活性形式[3]。而 PKM2 发生酪氨酸磷酸化后可导致其与 FBP 的结合位点发生改变,释放出 FBP,促进 PKM2 高活性的四聚体形式向低活性的二聚体形式转变。此外,PKM2 组氨酸(His)位点发生磷酸化后也可促进二聚体形式的形成[4]。Wang 等[5]研究发现,双加氧酶(jumonji C domain-containing dioxygenase 5, JMJD5)可以直接和 PKM2 的 C-端结合,通过与其相互作用促使 PKM2 二聚体形式的产生,从而降低 PKM2 的酶活性。另外,一些病毒蛋白质,如 16 型乳头状瘤病毒(HPV16)的 E7 蛋白可直接结合到 PKM2 上,促进其二聚体形式的产生,在细胞恶性转化过程中发挥重要作用[6]。

还有一些研究发现,与某些物质的结合可促进 PKM2 形成四聚体,如 Chaneton 等[7]报道,丝氨酸可与 PKM2 结合,促进 PKM2 四聚体形成,并激活其在细胞内的酶活性,促进有氧糖酵解,产生大量乳酸,为肿瘤细胞的生长与存活提供能量。Keller 等[8]研究表明,PKM2 还可以与嘌呤核苷酸从头合成途径的代谢产物,5-氨基-4-琥珀酸甲酰胺咪唑核糖核苷酸(SAICAR)结合并改变 PKM2 构象,促进四聚体形成,增强 PKM2 与底物 PEP 的亲和力,从而提高细胞内 PKM2 的活性。

1.1.3 M2 型丙酮酸激酶 (PKM2) 的表达调节

1.1.3.1 PKM2 的转录水平调控

PKM 基因的表达受多因素调控。越来越多的研究已经证实,多种转录因子可调控 PKM2 的转录活性,例如转录因子 SP1 (specificity protein 1) 和 SP3 可组成性地激活 PKM 基因的转录[9];低氧诱导因子 HIF-1 可以结合到 PKM 基因的第 1 个内含子内的低氧反应元件 (HRE),进而增强 PKM 基因转录激活。有趣的是,PKM2 蛋白可与 HIF-1 α 相互作用,促进 HIF-1 α 介导的基因转录,也包括 PKM2 自身的转录[10]。这样 HIF-1 α 与 PKM 基因转录形成一正向反馈调节。最近研究显示,EGFR 可促进 NF- κ B (p65) 结合到 PKM 启动子上,该过程依赖于 p65 与 HIF-1 α 的相互作用,因此在该激活转录过程中 HIF-1 α 起到

了共激活剂作用[11]。此外，哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 mTOR，可以通过激活 HIF-1 和 MYC 基因，间接调控 PKM2 的表达[12]。此外，有研究发现，在 PTEN 缺失的小鼠肝脏中，Akt2 通过上调过氧化物酶体受体 PPAR- γ （一种多功能的核受体）的表达进而激活 PKM 基因的转录[13]。

1.1.3.2 PKM2 的选择性剪切

David CJ 等[14]研究发现，hnRNPA1，hnRNPA2 和多嘧啶序列结合蛋白 PTB 等三个异质性核糖核蛋白，可通过结合在外显子 9 的侧翼序列，使外显子 9 在空间位置上受排挤，抑制 PKM 基因选择性剪切，外显子 10 的转录比例相应提高，上调 PKM2 的 mRNA 表达。同时，他们发现转录因子 c-Myc 可上调这三个异质性核糖核蛋白的编码基因的转录，从而促进 PKM2 的表达。因此在增殖旺盛的细胞和肿瘤细胞中，PKM2 的表达占主导地位。此外，研究者们发现，SRSF3，是剪接调控子丝氨酸富集蛋白家族中的一员，可通过直接结合外显子 10 上的剪接增强子，上调 PKM2 mRNA 的产量[15]。

1.1.3.3 PKM2 的翻译后水平修饰

PKM2 存在多种翻译后修饰手段调节其活性，其中磷酸化是最常见也最重要的修饰方式。Christofk 等[3]利用蛋白质组学方法筛选出 PKM2 是一种 pTyr 结合蛋白。同时，研究发现 PKM2 是一种可发生酪氨酸磷酸化的酶，成纤维细胞生长因子受体 1(fibroblast growth factor receptor 1, FGFR1)可直接磷酸化 PKM2 酪氨酸残基 Y105 位点，抑制其四聚体结构的形成，降低 PKM2 对底物 PEP 的亲和力。Yang 等[16]研究表明，EGFR(epidermal growth factor receptor, EGFR)及下游 ERK1/2(extracellular regulated kinase 2)激活，能催化 PKM2 的丝氨酸 37 (S37) 位点发生磷酸化，诱导 PKM2 发生核内易位。此外，Lei 等[17]实验数据显示，PKM2 赖氨酸 305 (K305) 位点可发生乙酰化，引发 PKM2 形成二聚体，降低其激酶活性，增强其与分子伴侣 Hsc70 之间的相互作用，通过分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA)过程，诱导 PKM2 蛋白发生溶酶体依赖性的降解。

1.1.4 M2 型丙酮酸激酶 (PKM2) 参与肿瘤代谢

代谢改变是肿瘤细胞的重要特征。正常细胞只有在缺氧的情况下进行糖酵

解,而肿瘤细胞无论氧气充足与否,都优先通过糖酵解代谢方式,消耗更多的葡萄糖并产生大量的乳酸,这一过程被称为有氧糖酵解,这一现象在 20 世纪 20 年代由德国生物学家 Otto Warburg 发现,故被称为 Warburg 效应[18]。过去的研究表明,PKM2 是调节这一效应的重要因子。以往观点认为,PKM2 主要在细胞质中与其他糖酵解酶一起构成糖酵解酶复合体,可高效催化葡萄糖经由糖酵解生成乳酸和能量,导致大量糖酵解中间产物在细胞中积累,这些代谢产物经由多种途径用于合成核酸、脂类和蛋白质等生物大分子,为肿瘤细胞的代谢及增殖提供原料,最终刺激肿瘤细胞生长。肿瘤细胞代谢和细胞周期进程是肿瘤形成的关键。Hitosugi 等[19]研究已经证实,FGFR1 介导的 PKM2 磷酸化可为肿瘤细胞的生长提供优势。在人类肺癌细胞系中,Y105 位点的突变体,即 PKM2 未发生酪氨酸磷酸化时,细胞的耗氧量增加且乳酸生成量减少,说明 Warburg 效应降低,从而抑制细胞增殖。另有研究表明,高浓度的葡萄糖可促使 PKM2 赖氨酸 305 (K305) 位点乙酰化,PKM2 K305 乙酰化使得 PKM2 酶活性受到抑制,同时促使 PKM2 与伴侣分子 HSC70 结合,经分子伴侣介导的自噬 (CMA) 在溶酶体中被降解[17]。此外在进一步的试验中,研究人员通过异位表达 PKM2 K305Q 突变体的方式证实 PKM2 乙酰化修饰可促使肿瘤细胞中糖酵解中间产物累积,从而促进细胞增殖及肿瘤生长。Luo 等[10]研究发现,脯氨酰羟化酶 3(prolyl hydroxylase 3,PHD3),可以直接诱导核内 PKM2 的脯氨酸 403 (Pro403) 和脯氨酸 308 (Pro308) 位点发生羟基化改变,进而使其结合并激活 HIF-1,最终引起糖酵解调控相关基因 GLUT1、LDHA、PTB 的表达上调,促进细胞糖代谢。

1.1.5 M2 型丙酮酸激酶 (PKM2) 参与信号通路调控

近年来,大量研究已经证实,PKM2 除了定位在细胞质在糖代谢中发挥重要的酶催化作用外,还可以定位于细胞核内,广泛参与蛋白的翻译后修饰、调控细胞生长相关基因转录等过程,以非代谢机制在肿瘤细胞的代谢和增殖中发挥重要作用。有研究发现[20],在有丝分裂原和原癌刺激下,PKM2 可通过 P300 乙酰基转移酶催化方式发生赖氨酸 433 (Lys433) 位点的乙酰化。这种改变降低了 PKM2 的酶活性,抑制 FBP 与之结合,促进 PKM2 核内易位。核内二聚体形式的 PKM2 具有蛋白激酶的活性,可通过磷酸化细胞信号传导与转录活化因

子 3 (Stat3) 的 Tyr705 位点而促进靶基因 MEK5 的转录激活, 在细胞增殖和肿瘤形成过程中发挥重要作用[21]。

Yang 等[16]研究表明, 在生长因子 EGF 的刺激下, 活化后的细胞外信号调节激酶 (ERK2) 通过其富含酸性氨基酸的结构域和谷氨酸天冬氨酸口袋组成的对接槽与 PKM2 第 429 位异亮氨酸和第 431 位亮氨酸 (Ile429/Leu431) 组成的结构相特异性结合, 两者结合促进 ERK2 对 PKM2 丝氨酸 37 (Ser37) 位点的磷酸化: 随后, 多肽脯氨酰基顺反异构酶 PIN1 结合催化 PKM2 发生顺反异构, 调控输入蛋白 importin- α 5 与 PKM2 第 399 位和第 400 位的精氨酸相结合, 并最终转运 PKM2 入细胞核。入核后的 PKM2 可作为 β -catenin 的共激活因子, 促进细胞周期蛋白 D1 (CCND1) 和 MYC 基因的转录表达, 以及 c-Myc-hnRNPI 介导的 PKM2 选择性剪切[22]。Yang 等[23]进一步研究发现, PKM2 在细胞核中, 还可通过磷酸化组蛋白 H3 (Histone H3) 的 T11 位点, 使去乙酰组蛋白酶 (histone deacetylase 3, HDAC3) 从细胞周期蛋白 D1 (CCND1) 和 MYC 启动子区域上解离以及 HistoneH3 的 K9 位乙酰化, 从而促进细胞周期相关蛋白的转录表达。最新研究发现, PKM2 还参与调控有丝分裂、胞质分离等细胞增殖过程[24, 25]。

此外, 研究发现[12], 膜受体酪氨酸激酶(RTKS)—P13/AKT-mTOR 信号通路过度活化后上调 PKM2 的表达, mTOR 通过 HIF-1 α 介导的 PKM 基因转录和 c-Myc 介导的选择性剪切两条信号机制共同上调 PKM2 的表达而引发 Warburg 效应, 进而促进肿瘤的发生发展。Lee 等[26]报道, PKM2 可与转录因子 Oct4 结合, 并促进其转录表达。我们实验室前期研究, 在两株肝癌细胞株 HepG2 及 Huh-7 中采用短发夹 RNA 转染, 最后筛选出基因沉默 PKM2 的稳转细胞株。用划痕实验、Transwell 及 CCK8 等体外实验评估了 PKM2 对肿瘤细胞侵袭、迁移及增殖方面的影响及其可能的作用机制, 结果表明, PKM2 可以通过调控 EGF/EGFR 下游信号通路 PLC- γ 1 和 ERK1/2 的活性及 TGF β /TGF β R 下游信号通路, 进而影响肝癌细胞的侵袭和迁移[27]。

1.2 肝癌的发生机制

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.